

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08510

研究課題名(和文)ATP放出性Maxi-Clチャネル関連分子の解析

研究課題名(英文)analyses of molecules which are related to an ATP releasing anion channel, Maxi-Cl.

研究代表者

岡田 俊昭 (Okada, Toshiaki)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・研究員

研究者番号：00373283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマウスC127細胞において同定されたMaxi-Cl コア分子、SLC02A1がチャネルのポアを構成する成分であるかあるいはそれ以外の重要な因子であるのかを示すこと、及び内在的に発現しているSLC02A1がC127細胞のみならず種々の細胞において普遍的にMaxi機能を負担する分子であることを主目的とした。研究期間中にこれらの目的の少なくとも一部は達成され、これまでに論文1報を公表、他に1報が受理された。さらに2度の学会発表を行った。また、関連する内容のレビューを共著者として2報発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外に放出されたATPは恒常性を維持するという生体にとって有益な反応を誘起する一方で、生体に不利益な反応をもたらすこともあるため、生理学的・医学的観点から広く注目されている。ATP放出性チャネルとして知られるMaxi-Clの分子機構を解明することにより、チャネルを介したATP放出による様々な生理学的・病理学的現象について分子論的な理解が深まることが期待される。医療分野においても、例えば心臓や脳における虚血・再灌流時に発生するATP放出が関与する組織のダメージ(心筋梗塞、脳梗塞)を軽減するような治療法の開発などの一助となることが期待される等、今後の研究の進展により様々な貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The molecular entity of Maxi-Cl which is an ATP-release anion channel had long been elusive. We recently identified SLC02A1 as a core factor of Maxi-Cl in murine C127 cell line. This study aimed to clarify whether SLC02A1 is a channel pore-forming component or other important subcomponent and whether endogenous expression of SLC02A1 is generally contributes to Maxi-Cl functions, current generation and ATP release, not only in C127 cells but also in the variety of cells. During a survey period, these purposes were partially, at least, validated and I published one thesis in and one another thesis has been accepted by a peer-reviewed journal. I had two times of conference presentation. I also published coauthored two review articles which are related to this project.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：アニオンチャネル Maxi-Cl ATP放出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マキシアニオンチャンネル (MACs) は大型のポア (直径 1.1 - 1.5 nm) を持つアニオンチャンネル群で、心筋や脳、腎臓など多様な組織、細胞において発現していることが知られている。MAC の代表的なチャンネルと考えられている Maxi-Cl は細胞容積増を感知し細胞容積減に働く容積感受性アニオンチャンネルの一つであり又、虚血などによってもたらされる低酸素・低栄養等の刺激においても活性化するが、その際、開いたポアから ATP を放出する ATP 放出性イオンチャンネルとして機能することが特徴的である。細胞外に放出された ATP は生体にとって正負両面の影響を与えるシグナル因子として働くことから、生理学的、医学的な分野で様々に注目されている。多様な組織、細胞において ATP 放出の経路となり得る Maxi-Cl の分子機構を明らかにすることは、それらの分野において重要な意味を持つと言える。しかし、Maxi-Cl がどのようなタンパク質から構成されているのかは、長い間不明だった。近年、研究代表者が所属する研究室において、プロスタグランジントランスポータ (PGT) として既に知られていた SLCO2A1 タンパク質が Maxi-Cl 構成分子の候補として同定された。これにより Maxi-Cl の分子生物学的な研究が可能となったが、SLCO2A1 がチャンネルのポアを構成するコンポーネントであるか、あるいはそれ以外の重要なコンポーネントであるか、詳細はまだ明らかでなかった。また、内在性の SLCO2A1 発現と Maxi-Cl 機能の関係はマウス乳腺維芽細胞である C127 においてのみ調べられており、他の細胞種についてはまだ不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究は Maxi-Cl の候補として同定された SLCO2A1 が Maxi-Cl チャンネルのポアを構成する成分であるか、それともその他の重要な因子であるかを明らかにすることを主目的とした。また、SLCO2A1 の同定に使用された細胞である C127 だけでなく、これまで Maxi 電流の存在が報告されている様々な細胞においても SLCO2A1 がそれらの電流の発生に関わっているか、つまり SLCO2A1 の発現と Maxi 機能 (電流の発現や ATP 放出) の発現の間に普遍性が存在するかを示すことも目的とした。

3. 研究の方法

SLCO2A1 は PGT として働くことが知られており、そのトランスポータ機能に影響を与えるアミノ酸変異が既に知られている。また、SLCO2A1 は皮膚骨膜肥厚症の原因遺伝子として報告されているが、この病気の患者にみられるアミノ酸変異も知られている。本研究ではそのような SLCO2A1 に機能変異を起こす可能性のあるアミノ酸に変異を導入した変異体を多数作成し、それらを細胞に発現させ、あるいは人工膜リポソームに再構成するなどして主に電気生理学的実験に供した。一部は Maxi-Cl の特徴的な機能である ATP 放出に関する実験にも用いた。内在性 SLCO2A1 の発現と Maxi 機能の発現の相関性については、マウスなど数種の培養細胞を用いて電気生理と ATP 放出実験によって検証した。

4. 研究成果

(1) チャンネルのイオン透過性は通常、ポアを構成する膜貫通ドメイン中やその近辺に存在する荷電アミノ酸に強く影響を受ける。変異により PGT としての機能を阻害すると報告されている K613、R560 はどちらも正電荷を持つアミノ酸である。本研究では K613G、R560N の変異体を作成し、まず C127 細胞に導入した。以下、電気生理学的解析はリポソームを用いた実験以外は inside-out patch 法で行った。野生型 (WT) SLCO2A1 を発現させた場合と比較すると、両変異体では ± 50 mV において観察される電流が 10-13% 有意に減少した。また、チャンネルの open probability にも差異がみられた (図.1)。

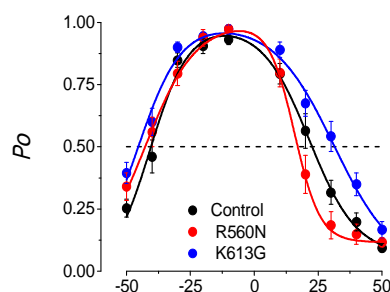


図.1 記録されたチャンネルの open probability。横軸は電圧 (mV)。K613G では WT に比べ正電圧側で上昇し、逆に R560N では下がっている。

次に変異がイオン選択性に与える影響について調べた。Maxi-Clは通常、アニオンに高い透過性を示しカチオンはほとんど通さないことが知られる。例えばClとNaの透過性を比較した場合には $P_{Cl}/P_{Na} > 6$ となる。本研究ではWT及びK613Gを、内在性SLCO2A1の発現がみられずMaxi-Cl電流も記録されないHEK293T細胞に導入し、種々のピペット内液、外液(バス液)を用いてイオン選択性等について検証した。その結果、K613GではWTと比べておよそ30%程度の電流量であること、ピペット内液のNa⁺をNMDGに置換した場合や、外液のNaCl濃度を下げた場合などに逆転電位がWTとは異なる方向へシフトすること等が観察された(図.2)。これらの現象からWTでは殆ど透過させないNa⁺をK613Gが透過させていると考えられる。

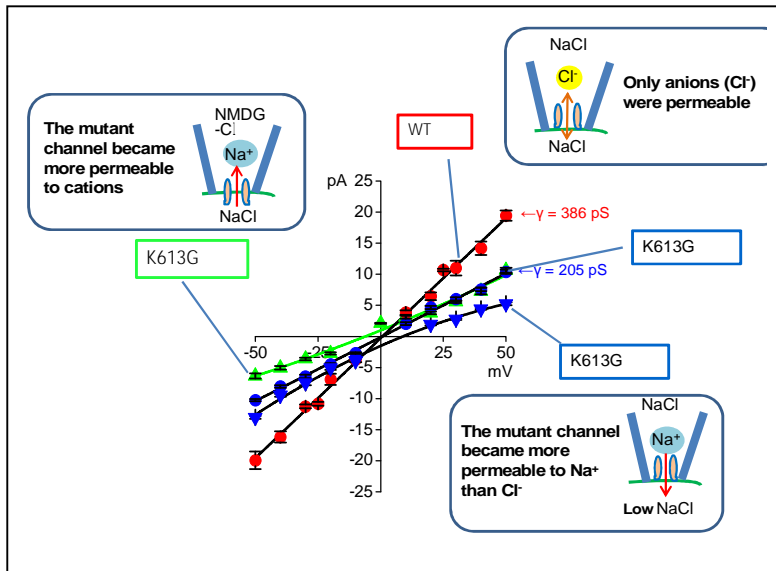


図.2 単一チャンネルにおけるI-V関係。WT()、K613G(, ,)。 、 は内液、外液が共にノーマルリンガーを使用しており、逆転電位はどちらも0を示している。 は内液のNa⁺をNMDGに置換しているがCl⁻の濃度は内外で等しい。この場合、K613GがWTと同様にCl⁻のみに透過性を示すのであれば逆転電位はシフトしないが、実

際には負の方向へシフトした。これはNa⁺に対する透過性が変わったことを示す。 は内/外液のNaCl濃度が異なっている(内/外:150mM/30mM)。この場合、WTであれば逆転電位は負の方向へシフトする(参考、図.3)のだがK613Gの場合には正の方向へとシフトした。これはK613GがNa⁺に対して透過性を示したのみならず、Na⁺の方へより高い透過性を示した結果と考えられる。

さらにWTとK613G変異体のタンパクを精製し、人工膜リポソームに再構成する実験も行った。リポソームに再構成されたWTタンパクは細胞で記録されるMaxi-Clとよく似たリニアなI-V関係を示した。またMaxi-Clの阻害剤であるGd³⁺により抑制されることを確認した。K613Gは細胞に発現させた場合ほどではないがWTに比べて小さな電流を示し、またピペット内液のNa⁺をNMDGに置換すると細胞に発現させた場合と同じく、逆転電位が負の方向にずれていた(図.3)

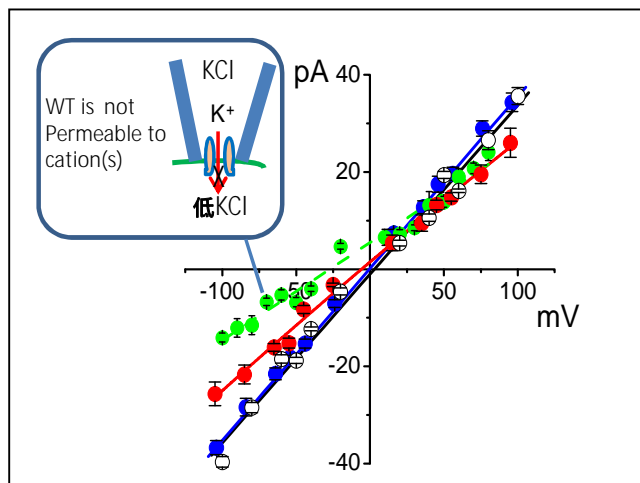


図.3 単一チャンネルにおけるI-V。WT(、○、)、K613G()、○は内液、外液共にノーマルリンガー液。 、 は内液のNa⁺をNMDGに置換したもので、WT()では逆転電位はノーマルリンガーと殆ど変わらないが、K613G()では図.2で示した場合と同様に負の方向にずれている。 ではNaClではなく、KClが用いられている。外液は低KCl濃度となっており(内/外:150mM/30mM)その為、逆転電位が負の方向へシフトした。

Maxi-Clの特徴的な機能として低浸透圧や低酸素によって誘起されるATP放出機能が挙げられる。ち

なみに Maxi-Cl を豊富に発現している C127 細胞に比べ Maxi-Cl を発現していない HEK 細胞では、低浸透圧刺激による一細胞当たりの ATP 放出量は著しく少ない。本研究では WT 及び K613G を ATP 放出実験にも供した。HEK 細胞にそれぞれの分子を発現させた後、細胞に低浸透圧刺激を与え放出される ATP 量を測定した。コントロールには GFP のみを発現させた細胞を用いた。どちらの場合にもコントロールに比べ 25-35% 程度の ATP 放出量増加が観察され、SLCO2A1 が ATP 放出に関与することが示された。(2)皮膚骨膜肥厚症の患者から同定された SLCO2A1 変異体 G222R と P219L についてもこれらを作成し、電気生理学的解析に用いた。G, P は共に荷電アミノ酸ではないが、G222R は非荷電アミノ酸から荷電アミノ酸へ変異している。これら 2 つの変異体をやはり HEK293T 細胞に発現させて、電気生理により解析したが、典型的な Maxi-Cl の電流は観察されなかった (n=14 each)。また G222R は K613G と同様に ATP 放出実験にも用いてその機能を検証したが、ATP 放出量の有意な増加は認められず、コントロールと変わらなかった。従って G222R と P219L については non-function 変異体であると結論付けられた。(3)研究期間中に ANNEXIN2 及び S100A10 の 2 つの Ca²⁺結合タンパクが Maxi-Cl 関連分子として同定されてきた。これらのタンパクは互いに結合して働くことがよく知られた分子である。これらは膜貫通ドメインを持たずチャンネルポアを構成する分子としてはやや不適のように見えるが、siRNA を用いてノックダウンすると Maxi-Cl の内在性電流が有意に減少し、また Maxi-Cl 電流は細胞内 Ca²⁺濃度に大きな影響を受けることがわかったので、これらのうち Annexin2 について Maxi-Cl 電流非発現細胞 (マウス C1300 細胞) に導入して電気生理的に解析した。結果として、ANNEXIN2 を単独で発現させても Maxi-Cl 様電流は観察されなかった。一方で SLCO2A1 を C1300 細胞に発現させた場合は Maxi-Cl 様電流が観察され、また SLCO2A1 と ANNEXIN2 を同時に発現させた場合には SLCO2A1 単独の場合よりも電流が大きくなった。これらの結果から、ANNEXIN2 はポア構成因子とは考えにくく、ANNEXIN2 と S100A10 は共に Maxi-Cl のサブコンポーネントであると結論付けた。

(1)、(2)の結果をまとめると；SLCO2A1 の細胞への強制発現により Maxi-Cl 様の電流が発生した、同様にリポソームに SLCO2A1 を再構成した場合にも電流が発生した、導入したアミノ酸点変異により電流の大きさや open probability などチャンネルの性質が変化した、さらにイオンの透過性にも影響することが細胞とリポソームの両方で確認された、Maxi-Cl の特徴的な機能である ATP 放出についても G222R のように変異による影響が観察された、となる。以上のことから、特に変異によるイオン透過性の変化から、本研究では SLCO2A1 が Maxi-Cl のポアを構成する因子であると結論付けた。(1)、(2)の結果は *EMBO J* (2017) に論文として発表した。論文掲載時には日本生理学雑誌 Web 版においても概要をサイエンストピックとして発表し、プレスリリースも行った。また同様の内容を第 95 回日本生理学会大会にてポスター発表した。(3)から得られた結果を含む論文は 2020 年 5 月に *Cell. Physiol. Biochem.* に受理された。

(4)内在性 SLCO2A1 の発現と Maxi 機能 (電流の発現、ATP 放出) の発現の相関性について、mouse L929、mouse embryonic fibroblast (MEF) 及び一部に rat C6 細胞を用いて実験を行った。これらの細胞において *Slco2a1* 遺伝子の発現と、パッチ膜に含まれる活性化した Maxi-Cl 様チャンネル (MAC) の数及び低浸透圧刺激による ATP 放出量の相関性を調べた (図.4)。パッチ膜に含まれる活性化チャンネルの数と細胞一個当たりの ATP 放出量には相関性が見られた。また RT-PCR による実験からこれらと *Slco2a1* 遺伝子の発現量の間にも相関性が見られることが示された。C6 細胞においては 7 回の試行において一度もチャネ

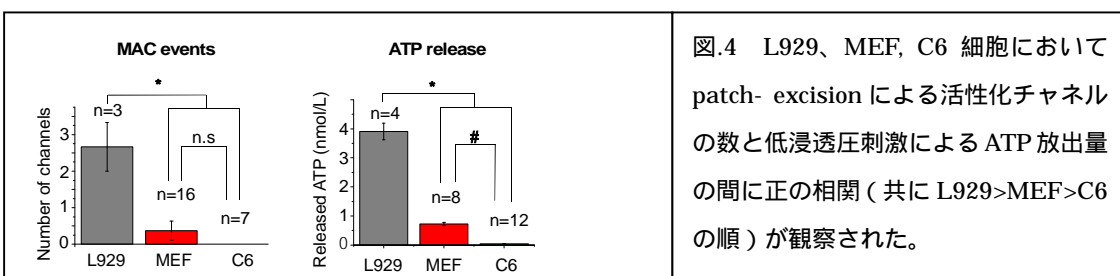


図.4 L929、MEF、C6 細胞において patch- excision による活性化チャンネルの数と低浸透圧刺激による ATP 放出量の間には正の相関 (共に L929>MEF>C6 の順) が観察された。

ルの活性化が見られず、ATP 放出量も他と比べて非常に少ないため以降の実験には使用しなかった。次に si-RNA を用いて *Slco2a1* をノックダウンし、電気生理による解析を行った。L929 についてはノックダウンによるチャンネル数の減少が見られたが、MEF 細胞では影響が見られなかった。これは MEF においては Maxi-Cl 様チャンネルが *Slco2a1* にコードされていない可能性を示唆する。Maxi-Cl はアニオンに対して I>Br>Cl の順に高いイオン選択性を示す。この点について MEF、L929 とともに確認したが、選択順は Maxi-Cl と変わりなかった。次に PGT 阻害剤であり、近年我々が Maxi-Cl の阻害剤としても働くことを見出した bromosulphophthalein (BSP) と bromocresol green (BCG) の効果を調べたところ、L929 では BSP、BCG はチャンネルの活性を抑制し、これは C127 において観察された Maxi-Cl に対する効果と同様であった。MEF では BSP の効果は L929 や C127 と同様の効果が観察されたが、BCG についてはその効果が顕著な例と、殆ど現れない例があり、この点 L929 や C127 とは異なっていた。(図.6)。このことから MEF においては Maxi-Cl 以外の MAC が発現している可能性が強く考えられる。

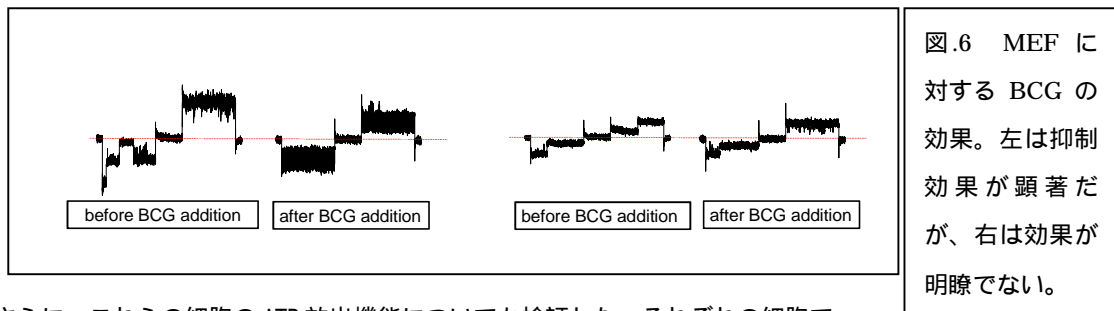


図.6 MEF に対する BCG の効果。左は抑制効果が顕著だが、右は効果が明瞭でない。

さらに、これらの細胞の ATP 放出機能についても検証した。それぞれの細胞で *Slco2a1* をノックダウンし、低浸透圧刺激により放出される ATP 量を計測した。結果はどちらの細胞でも ATP 放出量の減少は見られず、むしろ増加した。MEF に関しては *Slco2a1* をノックダウンすると常に培養ウェル内の細胞数がコントロールより少なくなっており、おそらく増殖が抑制されたと考えられるのだが、ここで培養ウェル内の細胞数が少ないと細胞一個当たりの ATP 放出量が増えるという相関がみられた(未発表データ)。増加分の ATP 放出経路については明らかでなく、この ATP 放出実験の結果から具体的な結論を導き出すことは困難だが、電気生理の結果も合わせて考えると MEF の場合には SLCO2A1 の Maxi-Cl 機能への関与は—全く無いとは言いつれないが—非常に少ないのではないかと推測される。一方、L929 の場合にも *Slco2a1* のノックダウンにより ATP 放出量に増加が見られたが、ノックダウンが細胞数に与える影響は特にみられなかった。電気生理の結果からは L929 に発現している SLCO2A1 は Maxi-Cl として機能していることが強く示唆される。放出量の増加は他の ATP 放出メカニズムが代償的に働いた可能性があるが、そのメカニズムとして ATP 放出性チャンネルとして知られる PANXIN1 (PANX1) の関与が考えられた。そこで、*Slco2a1* と *Panx1* のダブルノックダウンを検証してみた。又、刺激に使う低浸透圧溶液の組成を変更し実験条件の再検討も行ってみた。結果として、*Slco2a1* のノックダウンによる ATP 放出の増加は見られなくなり、逆に 10-15% 程度の減少が見られる場合もあったが、実験毎のデータにばらつきがあり有意な差を示す結果とはならなかった(未発表データ)。

以上をまとめると、内在性の SLCO2A1 の発現と Maxi-Cl 電流の発生の間には、特に L929 においては、一定の相関が見られた、ATP 放出に関しては通常状態においては SLCO2A1 の発現と ATP 放出量の間に関係があるように見えるが、ノックダウン実験からは SLCO2A1 の関与ははっきりしなかった、となる。上記(3)で SLCO2A1 と共に働く cofactor の存在を示したが、今回同定した ANNEXIN2 や S100A10 以外の cofactor も存在するかもしれない。細胞種によって cofactor の発現に差異があり、そのことで刺激に対する反応性に違いが生じる等の可能性も考えられる。それらは今後の研究テーマとなり得るが、いずれにせよ内在性 SLCO2A1 の発現と Maxi 機能の発現の相関性という課題には、まだ不明瞭な点が残ったといえる。(4)に記述したデータは未発表データを除き、第 9 回アジア・オセアニア生理学会連合(FAOPS) 大会においてポスターにて発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Md. Rafiqul Islam, Toshiaki Okada, Petr G. Merzlyak, Abduqodir H. Toychiev, Yuhko Ando-Akatsuka, Ravshan Z. Sabirov, and Yasunobu Okada	4. 巻 54
2. 論文標題 Annexin A2-S100A10 Represents the Regulatory Component of Maxi-Cl Channel Dependent on Protein Tyrosine Dephosphorylation and Intracellular Ca ²⁺	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell. Physiol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 538-555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33594/00000023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Y. Okada, T. Okada, M.R. Islam and R.Z. Sabirov	4. 巻 81
2. 論文標題 Molecular identities and ATP release activities of two types of volume-regulatory anion channels, VSOR and Maxi-Cl.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr. Top. Membr.	6. 最初と最後の頁 125-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Y. Okada, T. Okada, K.S. Numata, M.R. Islam, Y.A. Akatsuka, T. Numata, M. Kubo, T. Shimizu, R.S. Kurbannazarova, Y. Marunaka, and R.Z. Sabirov	4. 巻 71
2. 論文標題 Cell Volume-Activated and -Correlated Anion Channels in Mammalian Cells: Their Biophysical, Molecular and Pharmacological Properties.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmacological Reviews	6. 最初と最後の頁 49-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1124/pr.118.015917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ravshan Z. Sabirov, Petr.G. Merzlyak, Toshiaki Okada, Md. Rafiqul Islam, Hiromi Uramoto, Tomoko Mori, Yumiko Makino, Hiroshi Matsuura, Yu Xie & Yasunobu. Okada	4. 巻 36
2. 論文標題 The organic anion transporter SLC02A1 constitutes the core component of the Maxi-Cl channel.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The EMBO J.	6. 最初と最後の頁 3309-3324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.201796685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshiaki Okada and Yasunobu Okada
2. 発表標題 Examination of the contribution of SLC02A1 to maxi-anion channel currents in murine cells
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合(FAOPS)大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiaki Okada, Md. Rafiqul Islam, Petr G. Merzlyak, Ravshan Z. Sabirov, Yasunobu Okada
2. 発表標題 SLC02A1 is a pore-forming component of Maxi-Cl channel
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アラームシグナルATPを細胞外に放出するアニオンチャネルの分子の新規同定 http://www.nips.ac.jp/release/2017/10/atp_2.html 有機アニオントランスポータSLC02A1はマキシアニオンチャネルMaxi-Clのコアコンポーネント http://physiology.jp/science-topic/20390/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考